

ガスクロマトグラフィーにおける誘導体調整法に関する研究

著者	岩田 武彦
号	126
発行年	1975
URL	http://hdl.handle.net/10097/15844

氏 名 (本 籍) いわ た たけ ひこ
岩 田 武 彦

学 位 の 種 類 薬 学 博 士

学 位 記 番 号 薬 第 1 2 6 号

学位授与年月日 昭 和 5 1 年 2 月 2 5 日

学位授与の要件 学位規則第 5 条第 2 項該当

学 位 論 文 題 目 ガスクロマトグラフィーにおける
誘導体調製法に関する研究

(主 査)

論 文 審 査 委 員 教授 南 原 利 夫 教授 亀 谷 哲 治

教授 岡 野 定 輔

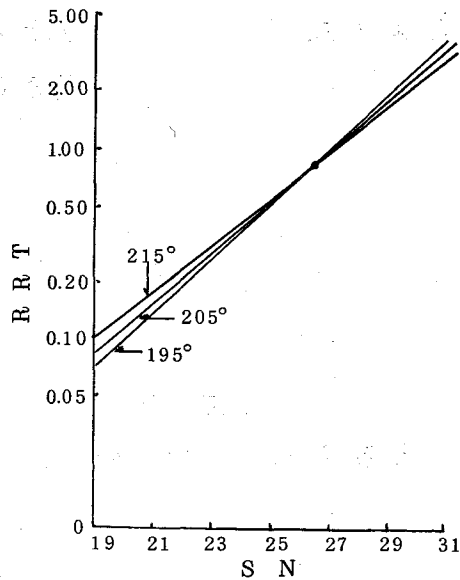
論文内容要旨

ガスクロマトグラフィー (GC) における誘導体の調製はおよそつぎのような目的のために行なわれる。すなわち、(1) 難揮発性物質を揮発性に変える、(2) 熱安定性を増し熱分解を防ぐ、(3) 分離係数を母化合物より大きくする、(4) 固定相に対する不可逆的吸着を少なくする、(5) 検出器に対する感度を増大させる、(6) 官能基の有無、未知物質の構造を推定する、(7) 同定を確実にする、(8) 光学異性体を分離する、(9) GC-マススペクトロメリー (MS) におけるスペクトル解析を容易にする、(10) 測定化合物の特殊性を高めてクロマトグラムのクリーンアップをはかる、などである。いうまでもなく誘導体調製は緩和な条件下短時間に、しかも定量的に反応が進行し、もし必要ならば簡単な後処理操作ののち、反応混合物のまま GC に注入できることが望ましい。

このような目標に向って数多くのすぐれた試薬が開発され、巧みな反応がくふうされてきたが、著者も生体成分とくにステロイドを対象に誘導体調製法の適用拡大をはかるとともに新規誘導体試薬の開発とその応用を検討した。

1. ステロイドの誘導体と保持値

まず、今日繁用されている各種誘導体試薬を用い estratriene, androstanone を対象として誘導体生成による保持時間 (RT) の変化から官能基の存在とその位置を知り、GC による同定をより確実にする手法を検討した。ステロイドの構造と GC における RT を関係づける代表的なパラメーターの一つとしては steroid number (SN) が知られている。SN は縦軸に cholestane を 1.00 とする相対保持時間 (RR T) の対数を、他方横軸に SN を目盛り 2 の標準物質 cholestane および androstane の炭素数 27, 19 をもってそれぞれの SN とし、この 2 点を結ぶ直線を標準曲線とする。任意のステロイドの SN はその RR T を同一条件で測定し、これを標準曲線に適用して求める。SN は近似的にステロイドの炭素数 N とステロイド核上の各種官能基に基づく SN 寄与 (F_1, F_2, \dots, F_n) の代数和であらわされ、いわゆる加成分則が成り立つとされ

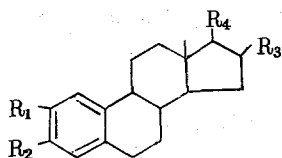


$$SN = N + F_1 + F_2 + \dots + F_n$$

Fig.1 Standard Curve For SN

ている (Fig. 1)。

まず、2 位、3 位に酸素官能基を有する estratriene 誘導体 62 種を調製してそれらの SN を求め、各種官能基に基づく SN 寄与ならびにそれらの加成性について検討した (Chart 1)。その結果、母核の *estra-1, 3, 5 (10)-triene* は SN 19 を示し、また D 環の 16 位、17 位置換基の SN 寄与はさきに報告されている飽和ステロイドの値とよく一致した。この事実は A 環の芳香化およびそれにともなう環融合の歪みも D 環上の置換基にはほとんど影響をおよぼさないことを示唆し興味深く思われる。



$R_1, R_2 = H, -OH, -OCH_3, -OAc, -OTMS, -OTFA$

$R_3, R_4 = H, =O, -OH, -OAc, -OTMS, -OTFA$

Chart 1

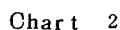
一方 A 環の 2 位および 3 位における各種置換基の SN 寄与をそれぞれ位置異性体間で比較するとき、遊離の水酸基同志にはほとんど差は認められないが、かさ高い置換基が導入されてアクセントがつくと、微少差は拡大されクロマトグラム上分離する傾向がみられた。また A 環、D 環に併せて置換基を有するジ置換体は加成則から求められる期待値と実測値がよく一致した。

2 位および 3 位の両者に酸素官能基をもつ化合物の SN に関しては実測値と期待値とが必ずしもよい一致をみしていない。しかし A 環上の 2 置換基を一組とみなせばその SN 寄与はほぼ一定の値を示し、加成則の適用が可能と思われる。

さらに 5α -androstanone 11 種および C-5 異性化により副生する 5β -androstanone-4-one, -6-one 2 種計 13 種の monoketone 体を合成しそれぞれの SN と各種 ketone 基にもとづく SN 寄与 (Δ SN) を測定した。ついで 3 種の oxime 誘導体、すなわち O-methyloxime, O-trimethylsilyloxime および O-benzyloxime に導き SN におよぼす影響を考察した。ほとんどの oxime 誘導体はクロマトグラム上単一のピークを示したが 2-ketone 体のみは oxime 誘導体とすると *syn/anti* 異性体と推測される 2 本のピークを与えた。各種誘導体としたときの Δ SN はステロイド核上 ketone 基の位置によって異なり置換基におよぼす立体障害は一般に SN の増大を抑える傾向にあった。誘導体の調製、とくに O-trimethylsilyloxime 化は ketone 基の位置の差異による微少差を拡大する効果があり、クロマトグラフ的挙動が酷似する 16-および 17-ketone の位置異性体もこの種誘導体にみちびくとき明確に分離した。

また、diketone 体について加成則の適用を検討したが期待値と実測値はよく一致し、2 つの

ついで O-trimethylsilyloxime 化が微少差を拡大する傾向にあることに着目し、これを acyl 転移により生成した 16,17-glycol monoacetate 異性体混合物の確認に応用した (Chart 2)。I を NaBH₄ 還元付したところ生成物は NMR スペクトルの所見から予期に反



2. 微量分析を目標とするガスクロマトグラフィー

— 231 —

トグラムの挙動を吟味した。5 α -Androstan-2-one のみは syn/anti 異性体生成にもとづくと思われる2本のピークを与えたが他はいずれも対称性のよい単一ピークを示した。

ついでこの種誘導体のGC-MSへの適用を検討するため dehydroepiandrosterone O-2-haloethyloxime 3-trimethylsilyl ether 2種をモデルに選り測定に供したがハロゲンの存在により一定の強度比をもった特徴的なイオンクラスターがマスペクトル上にみられることを確認した。

また、電子捕獲型検出器 (ECD) に適用可能なカルボニル試薬として pentafluorobenzyl-oxyamine を Chart 3 に示す経路に従って合成した。本試薬は誘導体の調製も容易であり、

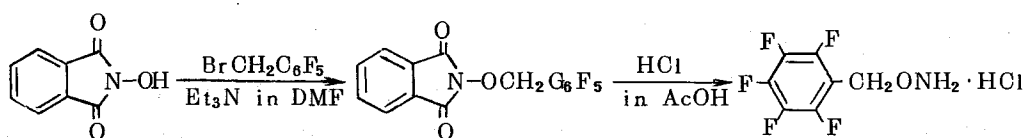
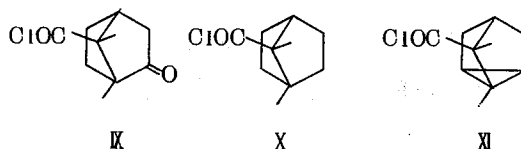


Chart 3

ECD に悪影響をおよぼす過剰試薬の除去も簡単であるうえ、高い EC 能を示し、pg オーダーの検出も可能であった。本法をヒト血漿中 dehydroepiandrosterone の定量に応用することを試み血漿 0.5 ml を試料に用いるとき再現性のよい分析結果が得られることを確認した。

3. 誘導体調製による光学異性体の分離

最後に、物理的性質が酷似し通常その分離が困難な光学異性体のうち DL-アミノ酸に適用可能な分離試薬の開発を試みた。天然のカンファー誘導体が揮発性に富み、rigidな環構造をもつことに着目し、3種の試薬 (Ⅶ, X, Ⅹ) を合成した。これら試薬のうちとりわけ rigidな環構造を持つ Ⅶ-teleantalinyll chloride (Ⅹ) が最もすぐれた分離を示した。固定相に



についても種々検討し PEGA が良い分離能を示したことからこのカラムを用い、12種の DL-アミノ酸の N-Ⅶ-teleantalinyll 誘導体について分離度を測定した。これらのうちとくにプロリン、アラニン、メチオニン、グルタミン酸は完全な分離を示したが本法は著者の知る限り光学活性試薬を用いる DL-アミノ酸の GC 分離で最も成功した例といえよう。

審 査 結 果 の 要 旨

近年におけるガスクロマトグラフィー (GC) のめざましい発展は instrumentation の進歩とともに誘導体調製に用いるすぐれた試薬, 巧みな反応の開発に負うところが少なくない。本研究は生体成分とくにステロイドを対象として誘導体調製の構造解析への適用拡大を図るとともに電子捕獲型検出器 (ECD) - GC, GC - マススペクトロメトリー (MS), 光学異性体分離に有用な新規誘導体試薬を開発し, その応用を検討したものである。

まず, ステロイド水酸基を代表的な誘導体にかえるときみられる保持値の変化を estratriene 62 種についてまとめ, 2, 3 位二置換体を例外として steroid number (SN) に加成則の成立することを明らかにした。

ついでステロイド核上にケトン基をもつ一連の androstanone 13 種を O-methyloxime, O-trimethylsilyloxime および O-benzylloxime に誘導し, そのときみられる Δ SN を系統的に測定した。また, ジケトン体について同様に Δ SN をまとめ加成性の成りたつことを立証した。さらに O-trimethylsilyloxime 化が微少差を拡大する傾向にあることに着目し, これとアシル転移により生成した位置異性体の弁別に応用した。

GC-MS においてクロルあるいはブロムを含む化合物はマススペクトル上天然同位体存在比にもとづくクラスターイオンがみられ, スペクトルの解析を容易にすることからカルボニル試薬として有用な alkoxyamine に注目し, そのハロゲン誘導体数種を合成してケトステロイドの GC-MS に応用することを検討した。その結果 2-chloroethoxyamine が適切な保持値を有し, かつ反応性にも富み, 誘導体試薬としてすぐれていることが判明した。

また, ECD に適用可能なカルボニル試薬として pentafluorobenzyl oxyamine を開発し, それが高い EC 能を有し, ヒト血漿中 dehydroepiandrosterone の定量に応用できることを確認した。

最後に DL-アミノ酸の分離に用いる誘導体試薬の開発を試み, 高い揮発性と固定した環構造をもつ天然のカンファに着目し 3 種の試薬を合成した。これらを用い代表的なアミノ酸光学異性体について検討した結果 L-teleantalinyll chloride が画期的な分離試薬であることを見出した。

以上のごとく本論文は誘導体の調製が構造の推定, 近縁化合物の弁別, 分析感度の増大, 光学異性体の分離, GC-MS への適用などにきわめて有用なことを示したものであり, 学位論文として価値あるものと認める。